Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۹۹، پیاپی ۴۱: ۵۸-۴۳

مقاله پژوهشی

شناسایی و توکسین‌زایی گونه‌های قارچ آسپرژِیلوس روی جیرهٔ غذایی طیور در شهرستان خرم‌آباد

رضا درویش‌نیا[۱]، مصطفی درویش‌نیا[۲*]، یونس چنگایی[۳]

۱- دانشجوی دکترای حرفه‌ای گروه علوم پایه دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی دانشگاه لرستان، ایران.

۲- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، ایران.

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۱/۰۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۷

چکیده

توکسین‌های قارچی مسئول بسیاری از بیماری‌ها و اپیدمی‌های انسانی و دامی می‌باشند. مواد غذایی انسان، خوراک دام و طیور در نقاط مختلف جهان همواره مورد حمله قارچ‌ها قرار می‌گیرند، ازجمله این قارچ‌ها گونه‌های آسپرژیلوس مولد آفلاتوکسین می‌باشند. این مطالعه به‌منظور شناسایی و بررسی جدایه‌های توکسین‌زای گونه‌های آسپرژیلوس در ۳۰ مرغداری شهرستان خرم‌آباد انجام شد. تعداد ۱۸۰ نمونه از جیره غذایی طیور جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. نمونه‌ها با استفاده از محیط کشت‌های مختلف مانند سیب زمینی، دکستروز، آگار (PDA) و عصارهٔ مخمر آگار (MEA) جداسازی و خالص‌سازی شدند. سپس جدایه‌ها با استفاده از کلیدهای معتبر قارچ‌شناسی و مقالات مورد شناسایی قرار گرفتند. توکسین‌زایی این قارچ با استفاده از محیط کشت نارگیل‌آگار، کروماتوگرافی لایه‌نازک (TLC) و کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC) بر روی بسترهٔ ذرت و بادام‌زمینی مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه این پژوهش در جیرهٔ غذایی طیور در مجموع ۳۸ جدایه شناسایی شد. ذرت با ۲۰ جدایه (۶۶/۶ درصد) و پس‌دان با سه جدایه (۱۰ درصد) به ترتیب دارای بیشترین و کمترین فراوانی بودند. همچنین با استفاده از محیط کشت نارگیل آگار و TLC توکسین‌زایی برخی از جدایه‌های این قارچ به اثبات رسید و در آزمایش‌های HPLC مشخص گردید این قارچ قابلیت تولید هر چهار نوع افلاتوکسین B1، B2، G1 و G2 را دارد. لذا باتوجه به حضور جدایه‌های مختلف توکسین‌زای این قارچ بر روی جیره‌های غذایی و بیماری‌زا بودن آن‌ها، رعایت استانداردهای جهانی در خصوص نگهداری جیره‌های غذایی توصیه می‌شود.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، بادام‌زمینی، خرم‌آباد،ذرت، مرغ‌داری

*نویسنده مسئول: مصطفی درویش نیا

آدرس: خرم‌آباد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان، ایران. تلفن: ۰۶۶۳۳۴۰۰۱۲

پست الکترونیک: Darviahnia.m@lu.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

دیر زمانی است که بشر اطلاع یافته است برخی از گونه‌های قارچ‌های مهم در مواد غذایی پس از مصرف شدن می‌توانند به‌عنوان یک خطر برای سلامتی انسان مطرح باشند، اما حتی تا زمان‌های اخیر نیز چنین تلقی می‌شد که وقوع کپک‌زدگی بر روی غذا فقط یک مشکل تغییر ظاهر آن است و خطری برای سلامتی محسوب نمی‌شود. علی‌رغم مطالعات فراوان طی نیمه اول قرن گذشته، فقط در دهه ۱۹۶۰ میلادی مشخص شد که متابولیت‌های برخی از انواع قارچ‌های رایج در مواد غذایی مسئول بیماری و مرگ دام‌ها است. در حال حاضر به خوبی ثابت شده است که متابولیت‌های ثانویه قارچ‌ها یا مایکوتوکسین‌ها مسئول بسیاری از اپیدمی‌ها در جوامع انسانی، دام و طیور و اثرات منفی بر غذا و تغذیه آن‌ها به‌ویژه در دوران اخیر بوده‌اند (۱، ۴). مواد غذایی انسان، خوراک دام و طیور در نقاط مختلف جهان همواره مورد حمله قارچ‌ها قرار می‌گیرند، ازجمله این قارچ‌ها گونه‌های آسپرژیلوس (*Aspergillus*) مولد آفلاتوکسین می‌باشند که می‌توانند قبل و بعد از برداشت در طول انبارداری و حمل‌ونقل مواد غذایی را آلوده نمایند (۲۱، ۳۶).

آلودگی آفلاتوکسینی محصولات کشاورزی یک نگرانی جهانی در ایمنی غذایی به شمار می‌رود. از آنجایی که آفلاتوکسین‌ها به‌صورت بالقوه سرطان‌زا هستند، مقدار آن‌ها در غذای انسان و دام در غالب کشورها به دقت مورد بازبینی و کنترل قرار می‌گیرد. به‌عنوان مثال اتحادیه اروپا حداکثر هشت میکروگرم در کیلوگرم برای آفلاتوکسین B1 و ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم را برای کل افلاتوکسین‌ها در محصولات کشاورزی تعیین کرده است (۲۰). آسپرژیلوس پارازیتیکوس (*A. parasiticus*) شایع‌ترین نوع این قارچ‌ها است و آسپرژیلوس فلاووس (*A. flavus*) بیشترین میزان سم آفلاتوکسین B1 را تولید می‌کند (۱۲). مطالعه‌های انجام شده نشان می‌دهد که *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* غیر سم‌زا بسیار نادر است و بنابراین اکثر موارد بیماری‌زایی این قارچ مربوط به تولید سم می‌باشد (۲۲). آفلاتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات بسیار سمی از دسته مایکوتوکسین‌ها هستند که در بیشتر محصولات گیاهی مانند بادام‌زمینی، پسته، نارگیل، سویا، ذرت، برنج، پنبه‌دانه و گندم یافت می‌شوند و به راحتی در خلال انبارداری و شرایط مناسب دمایی و رطوبت و با وجود سوبسترای مناسب توسط قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و آسپرژیلوس نومیوس (*A. nomius*) در خوراک انسان، دام و طیور به وجود می‌آید (۳، ۱۷).

قارچ *آسپرژیلوس* عامل بیماری آسپرژیلوسیس و تولید کننده مایکوتوکسین آفلاتوکسین بوده و مسمومیت غذایی ناشی از مصرف سموم آن موجب آفلاتوکسیکوزیس می‌شود که در طیور به دو فرم حاد و مزمن رخ می‌دهد. فرم حاد غالباً در جوجه‌های جوان در سه یا چهار هفته اول زندگی رخ‌داده و با مرگ‌ومیر بالا (۱۰ تا ۵۰ درصد) همراه است. علائم بالینی شامل تنفس سریع با دهان باز، دهن زدن، ترشح از بینی و چشم، افسردگی، خواب‌آلودگی، بی‌اشتهائی، تشنگی، اشکال در بلع و سیانوزه شدن نوک می‌باشد. در مراحل آخر تب، لاغری و عدم رشد دیده می‌شود. فرم مزمن در پرندگان مسن (به‌ویژه بوقلمون‌ها) و به‌صورت انفرادی رخ می‌دهد (۷، ۱۰، ۱۳، ۲۹). اندام اصلی مورد حمله آفلاتوکسین‌ها کبد است و در انسان موجب اختلال‌های شدید کبدی می‌شوند. در حیوان‌ها نیزموجب اختلال در دستگاه گوارش، جلوگیری از

www.SID.ir

Archive of SID

فعالیت سیستم ایمنی، کاهش تولیدمثل، افزایش ضریب تبدیل غذا، کاهش تولید شیر و تخم‌مرغ، کم‌خونی، یرقان و کاهش رشد می‌شود (۳۵). آفلاتوکسین‌های G1، G2، B1 و B2 که توسط قارچ‌های *آسپرژیلوس* تولید می‌شوند، توکسین‌های شایع در صنعت پرورش دام و طیور هستند که مسمومیت با آفلاتوکسین B1 شایع‌ترین آن‌ها است (۱۸، ۳۶). با توجه به‌احتمال حضور جدایه‌های توکسین‌زای این قارچ بر روی جیره‌های غذایی طیور و عوارض و خطراتی که این توکسین‌ها می‌توانند بر سلامت انسان و طیور داشته باشند، اطلاع از وجود یا عدم وجود این قارچ و جدایه‌های توکسین‌زای آن و همچنین روش‌های مختلف بررسی توکسین‌زا بودن این قارچ لازمه پژوهشی شد که می‌تواند ما را در یک مدیریت اصولی جهت جلوگیری و توسعه این قارچ بر روی جیره‌های غذایی یاری نماید.

مواد و روش کار

جمع‌آوری نمونه: به‌منظور شناسایی جدایه‌های قارچ *آسپرژیلوس* موجود در مرغداری‌های شهرستان خرم‌آباد از ۳۰ مرغداری فعال واقع در قسمت‌های مختلف حومه این شهرستان نمونه‌برداری صورت گرفت. نمونه‌های گرفته‌شده مواد مختلفی از جمله کلیه جیره‌های غذایی مورد استفاده طیور شامل: پیش‌دان (Peristarter)، میان‌دان (Grower)، پس‌دان (Finisher)، ذرت، سویا و بستر را تشکیل می‌دادند، بودند. از این تعداد مرغداری ۱۸۰ نمونه (به طوری‌که از پیش‌دان سه نمونه، پس‌دان سه نمونه، ذرت چهار نمونه، سویا چهار نمونه و بستر سه نمونه برداشته شد و هر کدام از نمونه‌ها جداگانه با هم مخلوط شد و به صورت یک نمونه تقریباً یک کیلوگرمی از هر جیره غذایی و بستر از هر مرغداری) در درون کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل و در یخچال با دمای چهار درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند. سپس از محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز، آگار (Potato Dextrose Agar) و عصاره مخمر، آگار (Malt Extract Agar) جهت کشت و جداسازی اولیه قارچ‌های‌موجود از روی نمونه‌ها استفاده شد. نمونه‌های حاصل به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند، سپس جهت خالص‌سازی قارچ‌ها از پرگنه‌های تازه رشد یافته زیر کشت تهیه گردید. به‌منظور خالص‌سازی جدایه‌های قارچی از روش تک اسپور کردن روی محیط آب آگار (Water Agar) دو درصد استفاده شد. بدین صورت که توسط سوزنی ظریف میزان کمی از اسپور قارچی به لولهٔ محتوی آب مقطر استریل منتقل شد و سپس توسط لام نئوبار رقت آن محاسبه شد. پس از تهیه رقتی مناسب (10^6 اسپور در میلی‌لیتر)، قطره‌ای از سوسپانسیون حاصل به محیط کشت آب آگار دو درصد انتقال یافت و با گذشت ۱۲ الی ۲۴ساعت، از پرگنه رشد یافته قارچ بر روی محیط کشت که از قبل ریخته و سرد شده بود در سه نقطه انتقال داده شد و به مدت پنج تا هفت روز در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس انکوباتور نگهداری شدند (۹).

محیط‌های کشت: جهت شناسایی قارچ‌ها از محیط کشت‌های مختلفی استفاده شد،از جمله این محیط کشت‌ها سیب‌زمینی، دکستروز، آگار است که یک محیط کشت عمومی شناخته شده است و برای کشت و جداسازی اولیه جدایه‌های مورداستفاده قرار گرفت، همچنین برای شناسایی جدایه‌ها از محیط کشت‌های اختصاصی نظیر: زاپک مخمر ساکارز ۲۰ درصد (CY20S)، زابک عصاره مخمر آگار (CYA)، عصاره مخمر آگار تهیه شده از کمپانی مرک (Merck) آلمان استفاده شد. در این پژوهش جهت شناسایی جدایه‌های

www.SID.ir

Archive of SID

به‌دست‌آمده باتوجه به ویژگی‌های مورفولوژیکی پرگنه‌های قارچی خالص‌سازی شده، ابتدا تشخیص اولیه احتمالی بر روی آن‌ها صورت گرفت. سپس با استفاده از روش میکروسکوپی جزئیات ریز بین آن‌ها تحت مطالعه قرار گرفت. بدین صورت که ابتدا به روش اسلاید کالچر با استفاده از محلول لاکتوفنل کاتن‌بلو از میسیلیوم قارچ‌های جدا شده لام تهیه شد و سپس با استفاده از میکروسکوپ نوری مشخصات آن‌ها ثبت گردید و با توجه به اختصاصات مورفولوژیکی، مورد شناسایی قرار گرفت (۲۰)

شناسایی جدایه‌ها: صفات ماکروسکوپی و صفات میکروسکوپی جدایه‌های حاصل با استفاده از کلیدهای شناسایی مورد بررسی قرار گرفت (۸، ۲۴، ۳۰). بدین ترتیب که ویژگی‌های ماکروسکوپی شامل میزان رشد و قطر پرگنه (میانگین قطر پرگنه در هر ظرف کشت) و رنگ پرگنه از دو سطح زیرین و زبرین یادداشت شد، برای بررسی ویژگی‌های میکروسکوپی ابتدا قارچ‌ها را به مدت سه روز روی محیط کشت آب آگار قرار داده، سپس از آن لام تهیه گردید و با استفاده از عدسی چشمی مدرج و میکروسکوپ با بزرگ‌نمایی ۴۰۰ و ۱۰۰۰ شکل، اندازه و تزئینات کنیدیوم‌ها (به‌طور میانگین ۱۵کنیدیوم)، طول و عرض پایه (به‌طور میانگین ۱۰پایه)، اندازه وزیکول (به‌طور میانگین ۱۰وزیکول) و دو ردیفی و یا یک ردیفی بودن آن‌ها، طول و عرض فیالید (Phialide) و متولا (Metulae) (به طور میانگین ۱۰عدد از هر کدام) مورد بررسی قرار گرفت (۸،۲۴،۳۰).

تعیین توکسین‌زایی اولیه قارچ: به منظور تعیین توکسین‌زایی از محیط کشت نارگیل-آگار (Coconut Agar) استفاده شد (۱۲، ۲۷). بدین‌صورت که ابتدا مقدار ۱۰۰ گرم پودر نارگیل در ۲۰۰ میلی‌لیتر آبجوش ریخته شد، پس از ۵ دقیقه به هم‌زدن در چند نوبت، زمانی که عصارهٔ نارگیل کاملاً خارج شد، مایع حاصل از چهار لایهٔ پارچه ململ (Cheese cloth) عبور داده شد و ۲۰ گرم پودر آگار به آن اضافه شد و به مدت ۱۵ دقیقه در فشار ۱/۱ اتمسفر و دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس در اتوکلاو سترون و در تشتک‌های پتری هشت سانتی‌متری ریخته شد. قارچ‌ها روی محیط کشت داده شدند و در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند و در زیر نور ماوراء بنفش (UV) با طول‌موج ۲۴۵ تا ۳۶۶ نانومتر مورد ارزیابی قرار گرفتند (۶، ۹، ۳۱). از پلت‌های حاوی قارچ‌های آسپرژیلوس توکسین‌زا خالص‌سازی شده کشت مجدد (subculture) تهیه نموده و به محیط‌های جدید انتقال داده شد. بعد از رشد مجدد قارچ از کشت‌های سه تا پنج روزه جهت تلقیح به بذر ذرت و بادام‌زمینی استفاده شد. جهت تولید مقدار مورد نیاز بستر آلوده به آفلاتوکسین از تعدادی ارلن مایر استفاده شد. در هر ارلن ۸۰ تا ۱۰۰ گرم ذرت یا بادام‌زمینی سالم ریخته و به هر یک از ارلن‌ها مقدار ۲۵ میلی‌لیتر آب اضافه شد و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱/۱ اتمسفر در اتوکلاو سترون شدند و ۲۴ ساعت بعد مجدداً (جهت جونه‌زنی اندام‌های مقاوم قارچ مانند کلامیدوسپور، اسکروت و جلوگیری از آلودگی پنهان) اتوکلاو شد.

بعد از خالص‌سازی قارچ، این قارچ بر روی محیط کشت سیب‌زمینی، دکستروز، آگار گسترش داده شد و سپس سوسپانسیون اسپوری به غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر در آب مقطر تهیه شد و مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون در شرایط کاملاً سترون در زیر هود لامینار (ساخت ژال ایران) به بسترها اضافه شد و درب آن‌ها را با پنبه و سپس فویل آلومینیومی کاملاً محکم نموده و با تکان دادن ارلن، سعی در پخش یکنواخت

www.SID.ir

Archive of SID

اسپورها در داخل بسترهای ذرت و بادام‌زمینی شد. سپس ارلن‌ها را در دمای معمولی اتاق با شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت دو هفته قرار داده و از روز سوم به بعد، روزی دو بار با احتیاط فراوان ارلن‌ها تکان داده شد. با این کار باعث شکسته شدن میسلیوم داخل هر ارلن شده، بعد از گذشت سه روز میسیلیوم قارچ به‌طور کامل رشد کرده و تمام سطح بذر را پوشش می‌دهد و در طول دوره رشد به نهایت رشد خود می‌رسد، در این مدت اگر جدایه‌های مورد آزمایش قادر به توکسین‌زایی باشند، توکسین مختص به خود را تولید خواهند نمود.

استخراج توکسین: به‌منظور استخراج توکسین‌های قارچی ابتدا محتویات ارلن‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۷۰ درجهٔ سلسیوس قرار داده شدند و سپس روی نمونه‌های آسیاب شدهٔ بذور آلوده، استونیتریل-متانول اضافه شد و سپس به مدت سه ساعت روی شیکر قرار داده شدند. مخلوط حاصل با کاغذ صافی واتمن صاف گردید و عصاره در فالکن‌های تمیز جمع‌آوری شدند و عصاره حاصل از ستون تصفیه حاوی رزین کاتیونی و مخلوط آلومینا–کربن عبور داده شدند. ابتدا و انتهای ستون با یک لایه پشم شیشه مسدود و بر روی آن یک گرم مخلوط آلومنیا–کربن اضافه شد و دوباره یک لایهٔ پشم‌شیشه جهت مسدودکردن آن، روی آن قرار گرفت و سپس رزین کاتیونی که از قبل به مدت ۱ ساعت در آب مقطر قرارگرفته بود، در ستون ریخته و بعد از آن عصارهٔ نمونه‌ها از ستون عبور داده شدند. عصارهٔ عبور داده شده ستون اول با استفاده از ستون تصفیه دوم به ترتیب شامل: پشم شیشه و آلومینا-کربن و پشم شیشه، مجدداً خالص شد و سپس عصارهٔ عبور داده شده از ستون تصفیه دوم برای تبخیر حلال به آون ۷۰ درجهٔ سلسیوس منتقل شد. پس از خشک شدن عصارهٔ استخراج شده، محلول متانول-آب به آن اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. سپس محلول متانول-آب و محلول استونیتریل-متانول نیز به آن افزوده گردید.

سنجش کلی سم‌های تولیدی قارچ‌ها به روش *TLC*: جهت تبخیر مجدد حلال دوباره در آون با دمای ۷۰ درجهٔ سلسیوس قرار گرفت و در نهایت به عصارهٔ خشک شده، محلول متانول-آب اضافه شد و عصاره‌های استخراج شده در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس نگهداری شدند (۱۱). بعد از استخراج سموم، محلول‌های نمونه و استاندارد آفلاتوکسین بر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) (صفحه آلومینیومی کروماتوگرافی لایه نازک همراه با سیلیکاژل) در یک راستا نقطه‌گذاری شدند، بعد از این‌که صفحه در مخزن کروماتوگرافی لایه نازک قرار داده شد و محلول متانول: استونیتریل (۸۸ : ۱۲) از آن بالا رفته و صفحه شسته شد. صفحه را در هوا خشک کرده، تحت نور لامپ ماوراء بنفش (۳۶۵ نانومتر) مورد قضاوت قرار داده شد و شدت نقطه فلورسانس آبی نمونه با نقطه فلورسانس استاندارد مقایسه شد (۲، ۱۵). به‌منظور تجمیع بیشتر آفلاتوکسین‌ها، عصارهٔ به‌دست آمده به ستون ایمونوافینیتی (Immunoaffinity) (ستون وابستگی ایمنی) متعلق به R-Biopharm Rhone UK. Glasgow (ساخت انگلستان) با قطر داخلی ذرات پنج دهم میلی‌متر وارد شد که به دلیل داشتن آنتی‌بادی‌های سطحی در روی ذرات، ابتدا افلاتوکسین‌ها را نگهداری کرده و سپس با عبور متانول، از ستون خارج‌شده و آب یونیزه اضافه شد.

ارزیابی کمی توکسین‌های موجود در عصاره با استفاده از روش *HPLC*: برای سنجش کمی آفلاتوکسین‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی

www.SID.ir

Archive of SID

بالا (HPLC) استفاده شد. بدین منظور ۲۰ میکرولیتر عصاره به ستون کروماتوگرافی فاز معکوس C18- Supelco Discovery به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی چهار و نیم میلی‌متر و قطر ذرات پنج میکرومتر متصل به دستگاه Unicam-Crystal-200 (ساخت انگلستان) تزریق شد. فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل (۲۰ درصد)، متانول (۲۰ درصد) و آب یونیزه (۶۰ درصد) می‌باشد که با سرعت یک میلی‌لیتر بر دقیقه از ستون عبور می‌نماید. دتکتور از نوع فلورسانس در طول موج تحریکی ۳۶۵ نانومتر و طول موج خروجی ۴۴۵ نانومتر تنظیم شد و به‌منظور تقویت فلورسانس آفلاتوکسین‌ها از ستون مشتق‌ساز تولیدکننده برم (PB) با قطر ذرات داخلی پنج دهم میلی‌متر R-Biopharm Rhone UK.Glasgow (ساخت انگلستان) استفاده شد. هرکدام از انواع آفلاتوکسین‌ها بر اساس مطابقت پیک خروجی با زمان بازداری پیک استاندارد و بر اساس غلظت نمونه استاندارد تعیین هویت و غلظت شد (۲۸، ۳۲).

روش تجزیه آماری

این آزمایش در چهار تکرار و دو تیمار (بستره کشت ذرت و بستره کشت بادام زمینی) بر طبق طرح کاملاً تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن صورت گرفت. برای تجزیه آماری داده‌ها، از نرم افزار SPSS 19 استفاده شد.

نتایج

پس از گذشت هفت روز از انتقال جدایه‌ها به محیط‌های کشت عصاره مخمر آگار، زابک عصاره مخمر آگار و زاپک مخمر ساکارز ۲۰ درصد، میانگین قطر پرگنه روی محیط کشت‌های زابک عصاره مخمر آگار و زاپک مخمر ساکارز ۲۰ درصد، ۶۵ میلی‌متر، رنگ سطح زبرین سبز زیتونی یا زیتونی مایل به زرد، میسلیوم‌ها سفید، ترشحات بی‌رنگ تا قهوه‌ای، سطح زیرین بی‌رنگ تا قهوه‌ای پررنگ بود. میانگین قطر پرگنه روی عصاره مخمر آگار، ۴۵ میلی‌متر و رنگ سطح بالایی سبز مایل به خاکستری، سطح زبرین بی‌رنگ و میانگین رشد پرگنه در ۳۵ درجهٔ سلسیوس ۶۰ میلی‌متر بود. ویژگی‌های میکروسکوپی وزیکول‌ها به‌طور عمده دو ردیفه، میانگین قطر وزیکول‌ها ۲۵-۲۸ میکرومتر و متولا سه چهارم تا تمامی سطح آن را می‌پوشاند، اندازه متولا ۵×۸ میکرومتر و اندازه فیالیدها ۴×۱۰ میکرومتر، کنیدیوم‌ها گرد تا بیضوی با قطر میانگین ۳/۹ میکرومتر با دیواره‌های صاف رویت شد. وجوه تمایز رنگ سبز پرگنه‌ها، وجود کنیدیوم‌هایی به قطر سه تا شش میکرومتر با دیواره‌های خاردار و زبر که از وجوه تمایز این گونه با گونه *آسپرژیلوس فلاووس* می‌باشد، منبع جداسازی این گونه در خوراک طیور بود. نتایج حاصل از آلودگی ذرت، سویا، پیش‌دان، میان‌دان، پس‌دان و بستر به جدایه‌ها و گونه‌های قارچ *آسپرژیلوس* در جدول (۱) آمده است. در این مطالعه ذرت با ۲۸ (۹۳/۳ درصد) برای *آسپرژیلوس فلاووس*، ۲۲ نمونه (۷۳/۳ درصد) برای *آسپرژیلوس نیجر*، ۲۰ نمونه (۶۶/۶ درصد) برای *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و میان دان با سه نمونه (۱۰ درصد) برای *آسپرژیلوس نیجر*، پس دان با چهار نمونه (۱۳/۳ درصد) برای *آسپرژیلوس فلاووس* و سه نمونه (۱۰ درصد) برای *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را به خود اختصاص دادند.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تعداد و درصد آلودگی ذرت، سویا، بستر، پیش‌دان، میاندان و پس دان به گونه‌های *Aspergillus*

نمونه	تعداد نمونه	تعداد و درصد جدایه‌ها		
		Aspergillus niger section *Nigeri*	*A. parasiticus* section *Flavi*	*A. flavus* section *Flavi*
ذرت	۳۰	۲۲ (۷۳/۳٪)	۲۰ (۶۶/۶٪)	۲۸ (۹۳/۳٪)
سویا	۳۰	۸ (۲۶/۶٪)	۶ (۲۰٪)	۱۵ (۵۰٪)
پیش‌دان	۳۰	۱۰ (۳۳/۳)	۵ (۱۶/۶٪)	۱۰ (۳۳/۳٪)
میان‌دان	۳۰	۳ (۱۰٪)	۴ (۱۳/۳٪)	۷ (۲۳/۳٪)
پس‌دان	۳۰	۵ (۱۶/۶)	۳ (۱۰٪)	۴ (۱۳/۳٪)
بستر	۳۰	۱۰ (۳۳/۳)	۱۵ (۵۰٪)	۵ (۱۶/۶٪)
مجموع	۱۸۰	۵۸	۵۳	۶۹
درصد آلودگی		۲۶/۱۱	۲۵/۳	۳۸

تجزیه واریانس تأثیر بستره کشت بادام‌زمینی و ذرت روی تغییرات میزان توکسین در این قارچ نشان داد، که تغییرات میزان توکسین تحت تأثیر این بستره‌های کشت، در همه توکسین‌های تولیدی قارچ بجز توکسین G2 معنی‌دار است. که این تغییرات تولید توکسین، برای توکسین‌های B2 و G1 در سطح یک درصد معنی‌دار شد ولی در تولید توکسین B1 در سطح پنج درصد تفاوت معنی‌دار شد (جدول ۲).

جدول ۲. تجزیه واریانس تأثیر بستره کشت ذرت و بادام‌زمینی روی توکسین‌های تولیدی قارچ *Aspergillus*

منابع تغییرات	درجه آزادی		مجموع مربعات (SS)	میانگین مربعات (MS)	مقادیر F	P-value
	تیمار	خطا				
B_1	۱	۶	۰/۲۵۹	۰/۲۵۹	۱۱/۷۵*	۰/۰۱۴
B_2	۱	۶	۰/۱	۰/۱	۱۶/۵۶**	۰/۰۰۷
G_1	۱	۶	۰/۰۵۸	۰/۰۵۸	۷۳/۰۱**	۰/۰۰۰۱
G_2	۱	۶	۰/۰۰۰۱	۰/۰۰۰۰۱	۳/۸۶ns	۰/۰۹۷

**سطح معنی‌داری P< ۰/۰۱، *سطح معنی‌داری ۰/۰۵ > P > ۰/۰۱، ns معنی دار نشدن P >۰/۰۵

با توجه به خاصیت فلورسانس آفلاتوکسین در زیر نور ماوراء بنفش و همچنین با توجه به اینکه هرچه غلظت سم بیشتر باشد، انتظار می‌رود شدت نور فلورسانس بازتابیده از آن نیز بیشتر باشد. بنابراین می‌توان گفت که مقدار کلی آفلاتوکسین تولیدی بر روی بستره ذرت بیشتر از بستره بادام‌زمینی است که نتایج کلی سنجش این سم با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیز همین موضوع را تائید می‌نماید (جدول ۳). بصورت کلی، بستره کشت ذرت نسبت به بادام‌زمینی باعث تولید توکسین بیشتری در قارچ *A. flavus* به میزان ۲/۳۲ میکروگرم در میلی لیتر شد. در بین توکسین‌های استخراجی، توکسین B1 با میزان ۱/۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر در بستر کشت بادام‌زمینی و ۱/۴۶ میکروگرم در میلی‌لیتر در بستر ذرت، بیشترین میزان تولید توکسین را در بین سایر توکسین‌های استخراجی دارد (جدول ۳).

www.SID.ir

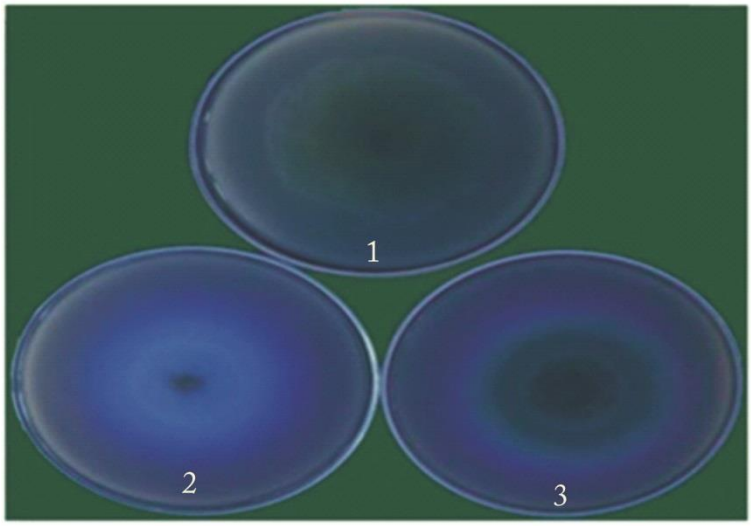
Archive of SID

جدول ۳. میزان کمی آفلاتوکسین‌های استخراج شده از روی دو بستره ذرت و بادام‌زمینی

	آفلاتوکسین (میکروگرم/میلی‌لیتر)				
نوع بستر کشت	B1	B2	G1	G2	مقدار کل آفلاتوکسین
بادام زمینی	۱/۱۰ [b]	۰/۰۸ [b]	۰/۴۸ [b]	۰/۰۱ [a]	۱/۶۷
ذرت	۱/۴۶ [a]	۰/۱۵ [a]	۰/۶۵ [a]	۰/۰۳ [a]	۲/۳۲
میانگین تولید توکسین	۱/۲۶	۰/۱۲	۰/۵۶	۰/۰۲	

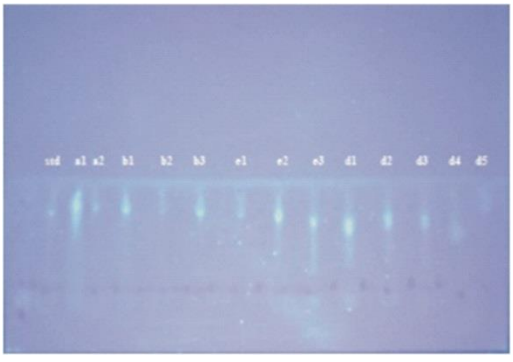
* حروف کوچک انگلیسی، گروه بندی آماری را نشان می دهد.

استفاده از محیط کشت نارگیل آگار برای تشخیص توکسین‌زا بودن جدایه‌ها استفاده گردید که در این روش جدایه‌های غیر توکسین‌زا در مقایسه با توکسین‌زا از خود فلورسانس کمتر، یا به‌طور کلی هیچ‌گونه فلورسانسی ساطع تکردند (شکل۱).



شکل۱. مقایسه جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زا بر روی محیط کشت نارگیل آگار: ۱- جدایه غیر توکسین‌زا، ۲ و ۳- جدایه‌های توکسین‌زا

نتایج نقطه‌گذاری بر روی صفحه کروماتوگرافی لایه نازک مشخص کرد، نمونه‌های افلاتوکسین استخراجی از روی بستره ذرت بعد از نقطه‌گذاری، شدت فلورسانس بیشتری از خود نشان می‌دهد و نور بازتابیده از آن بیشتر و حتی اندازه نقاط بزرگ‌تر می‌باشد (شکل۲).

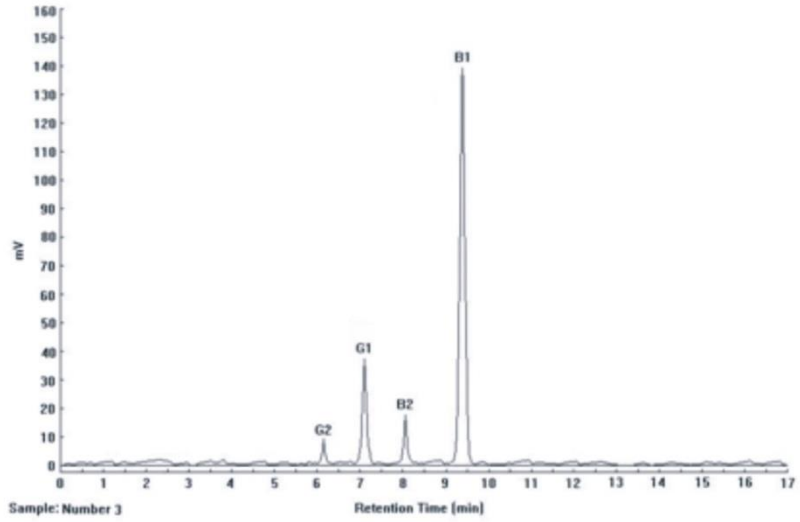


شکل۲. ارزیابی سم آفلاتوکسین به روش TLC در زیر نور UV و نقاط فلورسانس شده

www.SID.ir

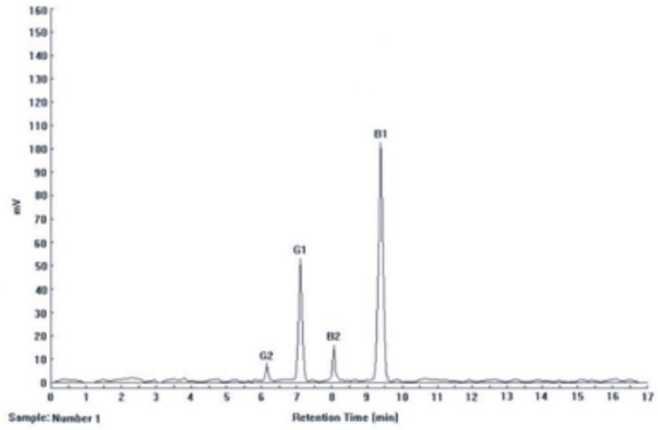
Archive of SID

بعد از مشخص شدن توکسین‌زایی کلی قارچ *آسپرژیلوس* بر روی این بسترها، برای تفکیک جز به‌جز آفلاتوکسین‌ها از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. نتایج حاصل از این مرحله از آزمایش نشان داد که قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و دو گونهٔ دیگر که در این آزمایش مورد استفاده قرار گرفتند، توانایی تولید چهار نوع افلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 را دارند ولی گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* مقدار افلاتوکسین B1 بیشتری نسبت به *آسپژیلوس نیجر* تولید می‌کنند (شکل ۳ و ۵).



شکل۳. کروماتوگرام آفلاتوکسین‌های تولید شده توسط قارچ *Aspergillus flavus* با روش HPLC

نتایج حاصل ازکروماتوگرافی مایع با کارایی بالای توکسین‌ها نشان داد که دو گونهٔ *A. niger* و *A. paprasiticus* بیشترین میزان آفلاتوکسین G1 نسبت به گونهٔ *A. flavus* را تولید نمودند (شکل ۴ و ۵).



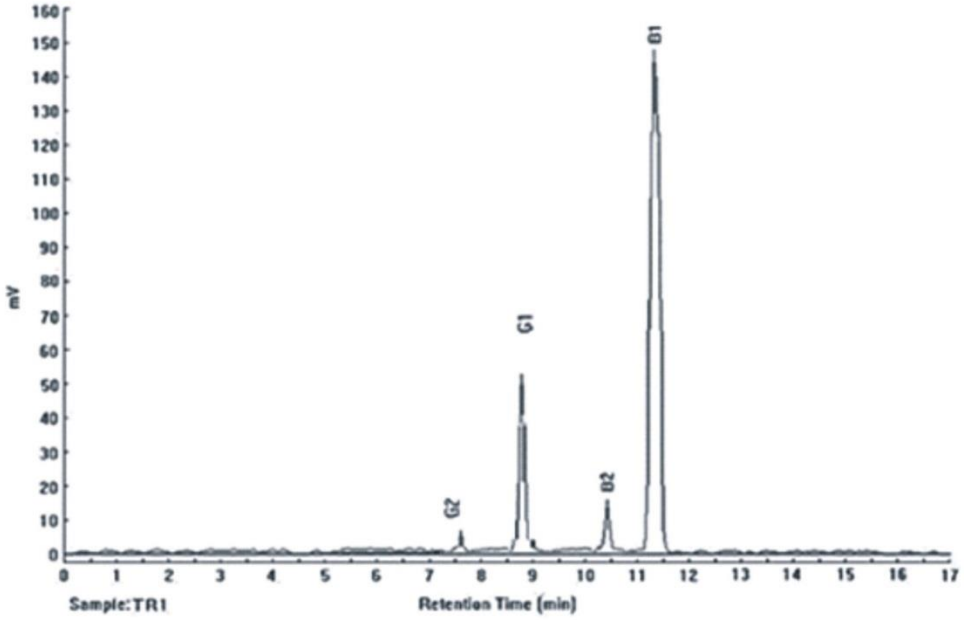
شکل٤. کروماتوگرام آفلاتوکسین‌های تولید شده توسط قارچ *Aspergillus niger* با روش HPLC

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین نتایج نشان داد که بر روی هر دو بستره (ذرت و بادام زمینی) مقدار آفلاتوکسین B_1 با میانگین تولید توکسین ۱/۲۹ میکروگرم در میلی‌لیتر خیلی بیشتر از سایر آفلاتوکسین‌ها بود و این میزان بر روی بستره ذرت بیشتر از بستره بادام‌زمینی می‌باشد، به‌طوری که روی بستره ذرت ۱/۴۹ و بر روی بادام‌زمینی ۱/۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از این نوع آفلاتوکسین را تولید کرده بود و بعد از آفلاتوکسین B_1، آفلاتوکسین G_1 با میانگین ۰/۵۶ میکروگرم در میلی‌لیتر قرار دارد (جدول۲).

نتایج بررسی حاصل از گاز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای توکسین‌های گونهٔ *A. parasiticus* نشان داد که این گونه نیز قادر به تولید هر چهار نوع آفلاتوکسین بوده ولی در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس آفلانوکسین B1 نسبت به سایر آفلاتوکسین‌ها به مقدار بیشتری تولید می‌شود. همچنین مقدار آفلاتوکسین G1 نسبت به آفلاتوکسین G2 بیشتر است و مقدار آفلاتوکسین B1 در این گونه نسبت به سایر گونه‌های مورد بررسی بیشتر بود (شکل ۵).



شکل۵. کروماتوگرام آفلاتوکسین‌های تولید شده توسط قارچ *Aspergillus parasiticus* با روش HPLC

بحث و نتیجه گیری

در بازدیدهای به‌عمل آمده از مرغداری‌های شهرستان خرم‌آباد با انباشت بسیاری از جیره‌های غذایی طیوری مواجه شدیم که بدون استفاده در داخل انبارها جمع‌آوری شده بودند و در بررسی‌های اولیه مشخص شد که ماکیان با مصرف روزانه این گونه مواد با تلفات سنگین روبه‌رو شده‌اند. در نمونه‌های منتقل شده به آزمایشگاه نیز مشخص گردید که غالباً آلودگی‌های کپکی موجود مربوط به جیرهٔ غذایی ذرت و سویا و عامل مرگ‌ومیر طیور بوده است. همچنین اکثر گونه‌های جداشده در نمونه‌ها نیز مربوط به دو گونه قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* بودند که هر دو از گونه‌های توکسین‌زا و کپک‌هایی هستند که قابلیت بیماری‌زایی و آلرژی‌زایی در انسان و طیور را دارا می‌باشند. این گفته در حالی است که بنا به گزارشی در سال ۲۰۰۵ تا مرحله تبدیل اقلام به دان مخلوط و آماده شده، به علت عدم اطلاع کافی بسیاری از مرغداران در نگهداری صحیح دان آماده شده و یا

www.SID.ir

Archive of SID

عدم وجود انبار و جایگاه مناسب برای نگهداری دان، به خصوص در مناطق و فصولی که درصد رطوبت هوا بالا می‌باشد، شرایط مساعد برای رشد بیشتر قارچ و تولید بیشتر سم فراهم خواهد شد (۲۳).

در این پژوهش مشخص گردید که قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی بستره ذرت توانایی تولید آفلاتوکسین بیشتری نسبت به بادام‌زمینی دارد که می‌توان علت توکسین‌زایی آن را در ترکیبات ذرت دانست و با توجه به اهمیت این سموم، حتی می‌توان با استخراج ترکیبات موجود در ذرت در تولید سم آفلاتوکسین و تجاری‌سازی آن به‌منظور کارهای علمی و تحقیقاتی استفاده کرد. آلودگی آفلاتوکسین معمولاً در مورد ذرت، بیشتر از بقیهٔ غلات گزارش شده است و ذرت با توجه به رطوبت نسبی دانهٔ آن می‌تواند محیط مناسبی جهت رشد قارچ باشد و سبب تولید مقدار بیشتری از آفلاتوکسین شود (۴). وجود *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *آسپرزیلوس فلاووس* که مولد انواع مختلف توکسین‌ها می‌باشند بر روی محصول ذرت که عمده جیرهٔ غذایی طیور را تشکیل می‌دهد، می‌تواند سلامت طیور را با تهدید مواجه سازد و موجب انتقال این سموم به تخم مرغ، گوشت و سایر فرآورده‌های دامی و تأثیر سوء بر سیستم ایمنی بدن، سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدان، سیستم گوارش و تولید مثلی طیور شود (۱۶). علاوه بر مرغداری‌ها، گاوداری‌ها نیز با مصرف ذرت آلوده به قارچ *آسپرژیلوس* از خطرات مایکوتوکسین‌ها مصون نیستند. آفلاتوکسین تولید شده توسط قارچ *آسپرژیلوس* می‌تواند تأثیر خود را به‌صورت حاد و مزمن بگذارد و وجود آفلاتوکسین در مواد غذایی حیوانات موجب کاهش شیر، تخم‌مرغ و وزن آن‌ها می‌شود (۲۴).

درگزارشی در سال ۲۰۰۱ از میان ۱۴۲ نمونه دانه‌های گیاهی جیره طیور جمع‌آوری شده از قسمت‌های مرکزی، جنوبی و شرقی تگزاس در هفت درصد نمونه‌ها میزان آفلاتوکسین بالاتر از ۱۰۰ میکروگرم در کیلوگرم بود که ۸۳ درصد این نمونه‌ها ذرت بودند (۵). همچنین در مطالعه‌ای دیگر میزان وقوع و فراوانی قارچ‌های آلوده کننده و تولید توکسین جیره غذایی طیور از چهار استان یمن، آفلاتوکسین غلظت بیشتری نسبت به سایر نمونه‌های جمع‌آوری شده داشت (۲۵). آفلاتوکسین به علت شیوع گسترده آن بر روی برخی از دانه‌های غذایی، به‌خصوص ذرت که ۵۰ تا ۶۰ درصد بسیاری از جیره‌های غذایی طیور را تشکیل می‌دهد، بزرگ‌ترین نگرانی را در ارتباط با مایکوتوکسین‌ها به وجود آورده است (۲۶). سازمان غذا و داروی ایالات‌متحده امریکا سطح قابل تحمل آفلاتوکسین را در جیرهٔ طیور ۲۰ قسمت در بیلیون (ppb) گزارش نموده است (۲۷). این سموم همچنین دارای اثر منفی بر رشد و تمامی پارامترهای دیگر نظیر ضریب تبدیل غذایی، وزن، میزان تولید تخم مرغ و غیره می‌باشند. در سال ۲۰۰۱ اثرات مخرب توکسین‌های قارچی در تغذیه بوقلمون‌ها با دان حاوی آفلاتوکسین بررسی شد و مرگ و میر آنها به سم آفلاتوکسین نسبت داده شد (۱۹). همچنین تولید آفلاتوکسین B1 قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* به مواد مغذی مانند نشاسته، آرژنین و غیره نسبت داده شده است و این مواد می‌توانند موجب القاء تولید بیشتر آفلاتوکسین در دانه‌های مختلف جیره غذایی طیور شوند (۲۸).

علاوه بر دام و طیور، انسان‌ها نیز از خطرات آفلاتوکسین‌ها در امان نیستند و انسان نیز با مصرف فرآورده‌های آلوده به قارچ آسپرژیلوس با عوارض ناشی از مصرف مایکوتوکسین‌ها مواجه خواهد شد. با

www.SID.ir

Archive of SID

توجه به مصرف بالای فرآورده‌های حجیم شده بر پایه بلغور ذرت توسط کودکان و نوجوانان، از آنجایی که تأثیرها و عوارض آفلاتوکسین بستگی به مقدار مصرف مکرر و مداوم حتی در مقادیر پایین دارد و هم‌چنین در نظر داشتن میزان سمیت آفلاتوکسین B1(LD50) که توسط سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) پنج دهم تا ۱۰ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن تعیین شده است، بدیهی به نظر می‌رسد که به دلیل پایین بودن وزن کودکان و دریافت آفلاتوکسین بیش از دوز مجاز و خصوصاً تجمع‌پذیری دراز مدت سموم در کبد و کلیه‌ها در زمان طولانی، عوارض سوء آن‌ها بیشتر بروز خواهد نمود. همچنین در تحقیقی میزان ترکیب آلبومین–آفلاتوکسین موجود در خون کودکان نه ماهه تا پنج ساله بنین (Benin) و توگو (Togo) واقع در غرب آفریقا به میزان ۹۹ درصد افزایش یافت که به دلیل وجود آفلاتوکسین در ذرت و بادام‌زمینی مصرفی رژیم غذایی بود (۱۴، ۳۱).

بادام‌زمینی مصرف‌شده توسط جوجه بوقلمون‌ها در کشور انگلستان سبب کشف آفلاتوکسین‌های قارچی و زمینه‌ساز شکل‌گیری مطالعات در این زمینه گردید، اکنون نیز بادام‌زمینی به‌عنوان یک جیره غذایی ارزشمند برای انسان و همچنین طیور در اکثر کشورها، یک میزبان مناسب برای قارچ *آسپرژیلوس* است و این قارچ قابلیت رشد بسیار بالایی بر روی این محصول دارد که می‌توان از این خصوصیت جهت توکسین‌زایی آن استفاده نمود، در کشور ما باتوجه به تنوع اقلیم انواع سویه‌های توکسین‌زای قارچ *آسپرژیلوس*، قادرند مواد غذایی را آلوده نموده و خسارت‌های مالی و جانی هنگفتی به بار آورند. همچنین به دلیل شرایط متنوع آب و هوایی، احتمال حضور طیف وسیعی از قارچ‌های مولد مایکوتوکسین به همراه سموم مربوطه در محیط وجود دارد و لازم است با انجام پژوهش‌های اصولی و منطقی از شیوع این قارچ بر روی بسترهای مواد غذایی انسان و حیوانات جلوگیری کرد. در طی پژوهش‌های انجام‌گرفته، بیان‌شده که یکی از مهم‌ترین و عمده‌ترین اثرات نامطلوب رشد قارچ‌ها بر روی مواد غذایی تولید سموم قارچی یا مایکوتوکسین‌ها است در میان مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین‌ها مهم‌ترین و سمی‌ترین آن‌ها هستند که توسط گونه‌های آسپرژیلوس بخصوص آسپرژیلوس پارازیتیکوس تحت شرایط مناسب بر روی مواد غذایی تولید می‌شوند و مصرف چنین مواد غذایی عوارض و خطرات فراوانی برای انسان و دام به همراه دارد (۳۳).

طبق مطالعات صورت گرفته مشخص شده قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* بیشترین میزان تولید آفلاتوکسین را در رطوبت ۳۰ درصدی بذر ذرت دارد (۳۴). *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تحت شرایط مطلوب دما و رطوبت در طیف گسترده‌ای از بسترهای طبیعی به‌سرعت رشد می‌کند (۳۵). ازاین‌رو می‌توان با بهره‌گیری از روش‌های اصولی با رساندن رطوبت به نسبت زیر حد بهینه برای رشد قارچ در مراحل مختلف برداشت تا بسته‌بندی و انبارداری از رشد قارچ و توکسین‌زایی و در نهایت سرطان‌زایی آن جلوگیری کرد. وجود آلودگی به قارچ *آسپرژیلوس* و سم آفلاتوکسین در نمونه‌های مورد آزمایش می‌تواند در اثر عدم دقت کافی در هنگام خشک کردن این مواد باشد، زیرا قارچ‌ها به دلیل گسترش بسیار زیاد و پتانسیل رشد بالایی که دارند به محض فراهم شدن شرایط رشد، شروع به رشد می‌کنند (۲۳). به طور کلی می‌توان گفت بستر و جیره غذایی طیور در شهرستان خرم‌آباد آلوده به عوامل قارچی و توکسین‌زا می‌باشد که این امر موجب آلودگی تولیدات دامی و نیز مرگ و میر در

www.SID.ir

Archive of SID

طیور و مصرف‌کنندگان این گونه تولیدات می‌شود. همچنین مشخص شد که محیط نارگیل اگار محیط مناسبی برای تفکیک جدایه‌های توکسین‌زا و غیرتوکسین‌زای جدایه‌های *آسپرژیلوس* می‌باشد و نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالای توکسین‌ها نشان داد که گونه‌های *Aspergillus flavus*، و *A. parasiticus* مورد بررسی در این پژوهش توانایی تولید چهار نوع آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 را دارند و در بین توکسین‌های استخراجی مقدار آفلاتوکسین B1 در گونهٔ *A. flavus* روی بستره ذرت نسبت به بادام بیشترین مقدار توکسین را تولید نمود. به طور کلی بستره ذرت با بیشترین مقدار تولید توکسین محیط مناسبی برای رشد قارچ و توکسن‌زایی قارچ آسپرژیلوس می‌باشد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان بر خود واجب می‌دانند از سرکار خانم مهندس مومنی کارشناس آزمایشگاه قارچ شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه لرستان تشکر و قدردانی بعمل آورند.

منابع

1- Abbas H. K., Shier W. T., Horn B. W., Weaver M. A. (2004). Cultural methods for aflatoxin detection. *Toxin Review*, **23**: 295-315.

2- Afzali N., (1988). Biotechnological method to counteract Aflatoxicosis in broiler breeders. PhD Thesis, UniversityAgricultural Science, dbase. irandoc. ac.ir/00234/00234048. htm.

3- Ahmed S. A., Abo El-Makarem H. S. (2013). Aflatoxin M1 levels in milk and some dairy products in Alexanderia city. *Assiut Veterinary Medical Journal*, **59**: 93-98.

4- Akinmusire O. O., El-Yuguda A. D., Musa J. A., Oyedele O. A., Sulyok M., Somorin Y. M., Ezekiel C. N., Krska L. (2019). Mycotoxins in poultry feed and feed ingredients in Nigeria. *Mycotoxin Research*, **35**: 149-155.

5- Algabr H. M., Alwaseai A., Azumir M. A., Hssen A. A., Taresh S.A. (2018) Occurrences and frequency of fungi and detection of mycotoxins on poultry rations in Yemen. *Bulletin of the National Research Centre*, **42**: 1-12.

6- Arseculeratne S., De Silva L., Wijesundera S., Bandunatha C. (1969). Coconut as a medium for the experimental production of aflatoxin. *Applied Microbiology*, **18**: 88-94.

7- Bandyopadhyay R., Kiewnick S., Atehnkeng, J., Donner M., Cotty P., Hell K. (2005). Biological control of aflatoxin contamination in maize in Africa. Conf. Int. Agric. Res. Dev. Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Switzerland.

8- Choi Y. W., Hyde K. D., Ho W. (1999). Single spore isolation of fungi. *Fungal Diversity*, **3**: 29-38.

9- Cutuli M., Cuellar A., Camara J., Mateos A., Suarez G. (1991). Different media and methodologies for the detection of aflatoxin production by *Aspergillus flavus* strains isolated from trout feed. *Mycopathology*, **113**: 121-125.

10- Diaz G., Calabrese E., Blain R. (2008). Aflatoxicosis in chickens (*Gallus gallus*): An example of hormesis. *Poultry Science*, **87**: 727-732.

11- Davari M., Safaei N., Darvishnia M., Didar Taleshmikaeel R. (2014). Occurrence of deoxynivalenol producing isolates of *Fusarium graminearum* species complex associated with head blight of wheat in Moghan area. *Journal Crop Protection*, **3**: 113-123.

12- Davis N., Iyer S., Diener U. (1987). Improved method of screening for aflatoxin with a coconut agar medium. *Applied Environment Microbiology*, **53**: 1593-1595.

www.SID.ir

Archive of SID

13- Deshpande S. (2002). Fungal toxins. Handbook of food toxicology. New York: Marcel Decker.

14- Egal S., Hounsa A., Gong Y., Turner P., Wild C., Hall A., Hell K., Cardwell K. (2005). Dietary exposure to aflatoxin from maize and groundnut in young children from Benin and Togo, West Africa. *International Journal Food Microbiology*, **104**: 215-224.

15- Fente C., Ordaz J. J., Vazquez B., Franco C., Cepeda A. (2001). New additive for culture media for rapid identification of aflatoxin-producing *Aspergillus* strains. *Applied Environment Microbiology*, **67**: 4858-4862.

16- Fouad A.M., Ruan D., El-Senousey H.K., Chen W., Jiang S. Zheng C. (2019). Harmful effects and control strategies of aflatoxin B1 produced by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* strains on poultry: Review. *Toxines*, **176**: 1-21.

17 -Fu Z., Huang X., Min S. (2008). Rapid determination of aflatoxins in corn and peanuts. *Journal of Chromatography*, **1209**: 271-274.

18- Galvano F., Ritieni A., Piva G., Pietri A. (2005). Mycotoxins in the human food chain. *The Mycotoxin Blue Book*. **1**: 187-224.

19- Garcia D., Ramos A. J., Sanchis V., Marin S. (2009). Predicting mycotoxins in foods: A review*: Food Microbiology*, **26**: 757-769.

20- Harris J. L. (1986). Modified method for fungal slide culture. *Journal Clinical Microbiology*, **24**: 460-461.

21- Henke S. E., Gallardo V. C., Martinez B., Baily R. (2001). Survey of aflatoxin concentrations in wild bird seed purchased in Texas. *Journal Wild Disease*, **37**: 831-835.

22- Horn B., Dorner J. (1999). Regional differences in production of aflatoxin B1 and cyclopiazonic acid by soil isolates of *Aspergillus flavus* along a transect within the United States. *Applied Environment Microbiology*, **65**: 1444-1449.

23- Kana J. R., Gnonlonfin B. G. J., Harvey J., Wainaina J., Wanjuki I., Skilton R. A., Teguia A. (2013). Assessment of aflatoxin contamination of maize, peanut meal and poultry feed mixtures from different agroecological zones in Cameroon. *Toxins*, **5**: 884-894.

24- Klich M. A., Pitt J. I. (1988). A laboratory guide to the common *Aspergillus* species and their teleomorphs. Common wealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.

25- Lanyasunya T. P., Wamae L. W., Musa H. H., Olowofeso O., Lokwaleput I. K. (2005). The risk of mycotoxins cantamination of dairy feed and milk on small holder dairy farms in Kenya. *Pakistanian Journal Nutrition*, **4**: 162-169.

26- Lee S., Hanna M. A., Bullerman L. B. (1986). Carbon dioxide and aflatoxin production in high-moisture corn treated with potassium sorbate. *Cereal Chemistry*, **2**: 82-84.

27- Lin M., Dianese J. (1979). A coconut agar medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp.. *Phytopathology*, **66**: 1466-1469.

28- Liu J., Sun L., Zhang N., Zhang J., Guo J., Li c., Rajput S. A., Qi d. 2016. Effect of nutrient in substrates of different grains on aflatoxinB1 production by *Aspergillus flavus*. *Biomed Reaserch International*, **216**: 1-10

29- Morrison D. M., Ledoux D. R., Chester L. F. B., Samuels C. A. N. (2017). A Limited Survey of Aflatoxins in Poultry Feed and Feed Ingredients in Guyana. *Veterinary Science*, **4**:1-7.

30- Nyongesa B. W., Okoth S., Ayugi V. (2015) Identification key for *Aspergillus* species isolated from maize and soil of Nandi county, Kenya. *Advances in Microbiology*, **5**: 205-226.

www.SID.ir

Archive of SID

31- Perez M., Henke S. E., Fedynich A. M. (2001). Detection of aflatoxin-contaminated grain by three granivorous bird species. *Journal of wild Disease*, **37**: 358-361.
32- Shephard G. (2009). Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **395**: 1215-1224.
33- Stanley V. G., Ojo R., Woldesenbet S., Hutchinson D. H., Kubena L. F. (1993). The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*, **72**: 1867-1872.
34- Stoloff L. (1983). Aflatoxins as a cause of primary liver – cell cancer in the United States: A probably study. *Nutrition Cancer*, **5**: 165-186.
35- Yitbarek M. B., Tamir B. (2014). Mycotoxines and/or Aflatoxines in Milk and Milk Products: *Review American Science Research Journal Engineering Technology Science (ASRJETS)*, **4**: 1-32.
36- Yunus, A., Ghareeb K., Abd-El-Fattah A., Twaruzek, M., Böhm J. (2011). Gross intestinal adaptations in relation to broiler performance during chronic aflatoxin exposure. *Poultry Science*, **90**: 1683-1689.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 16, Issue 2, 2020

Identification and Toxinogenesis of *Aspergillus* spp. fungus on poultry diet in Khorramabad

Reza Darvishnia[1], Mostafa Darvishnia[2]*, Younes Changaee[3]

1- Verterinary Student, Department of Basic Science, Faculty of Veterinary Medicine, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

2- Associate Proffessor, Department of Planr Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

3- MSc. Student, Department of Planr Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran.

Received: 23 March 2020 *Accepted: 7 July 2020*

Abstract

Fungal toxins are responsible for many human and animal diseases and epidemics. This study was performed to identify and investigate the toxicogenic isolates of Aspergillus species in 30 poultry farms in Khorramabad. The 180 samples of poultry diets were collected and transferred to the laboratory. The samples were isolated and purified using different culture media such as Potato Dextrose Agar (PDA) and Yeast Extract Agar (YEA). Then the isolates were identified using valid mycological keys and articles. The toxinogenesis of this fungus was investigated using coconut agar medium, thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) on corn and peanut media. The results showed that 38 isolates were identified in the poultry diet. The corn with 20 isolates (66.6%) and finisher with three isolates (10%) had the highest and lowest frequencies, respectively. Also, by using coconut agar and TLC toxinogenesis, some of the isolates of this fungus have been proved and in HPLC experiments it was determined that this fungus has the ability to produce all four types of aflatoxins B1, B2, G1 and G2. So due to the presence of different toxinogenic isolates of this fungus on the diet and their pathogenicity, compliance with international standards of maintenance diets is recommended.

Keywords: Aflatoxin, Peanut, Khorramabad, Corn, Poultry

**Corresponding author: Mostafa Darvishnia*

Address: Khorramabad, Department of Planr Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Iran.

Tel: +986633400012

Email: Darviahnia.m@lu.ac.ir

www.SID.ir